

18.11.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 13 JAN 2005	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年11月20日
Date of Application:

出願番号 特願2003-391132
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-391132]

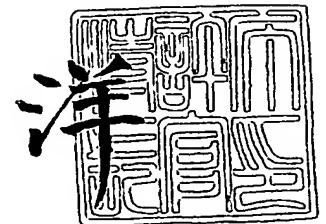
出願人 日本澱粉工業株式会社
Applicant(s):

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3117514

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03NDK0003
【提出日】 平成15年11月20日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 C07D309/00
【発明者】
 【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市南栄 3 - 2 0 日本澱粉工業株式会社 内
 【氏名】 吉永 一浩
【発明者】
 【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市南栄 3 - 2 0 日本澱粉工業株式会社 内
 【氏名】 若松 智波
【特許出願人】
 【識別番号】 390015004
 【氏名又は名称】 日本澱粉工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100080609
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大島 正孝
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006954
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【物件名】 図面 1
 【包括委任状番号】 0017600

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

1, 5-D-アンヒドロフルクトースの溶液を pH 10 以下で 100℃以上の温度で加熱することを特徴とする、アスコピロン P の製造方法。

【請求項 2】

加熱を 120℃以上の温度で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

加熱を 1 秒ないし 24 時間行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

pH 10 以下が pH 2 ないし 7 未満である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

pH 10 以下が pH 2 ないし 4 である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

加熱を抗酸化剤の存在下で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

抗酸化剤が、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸およびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムよりなる群から選ばれる少なくとも 1 種である請求項 6 に記載の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】アスコピロンPの効率的な製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明はアスコピロンP (2-hydroxymethyl-5-hydroxy-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one) の効率的な製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アスコピロンP (構造式: 図1) は、1978年にセルロースの熱分解により生成することが初めて報告され ([非特許文献1] 参照)、その後、 ^1H -NMRおよび ^{13}C -NMR、赤外線分光法 (IR) により構造が解析され、三次元構造が明らかにされた。

【0003】

アスコピロンP (以下、APPという) は、抗酸化能、抗菌能さらに褐色変化防止能を有することが報告されており ([特許文献1]、[特許文献2]、[特許文献3] 参照)、昨今、その非常に高い機能性に期待が高まっている物質である。また自然界ではある種の真菌類が生産することも報告されている ([非特許文献2] 参照)。

【0004】

APPの調製方法に関してはいくつかの報告がある。セルロースの熱分解による方法では、APPの収率が原料であるセルロースに対して僅か1.4%程度と低く、さらに、その後の精製に非常に複雑な分離工程が必要なため、工業的な生産には本方法は現実的ではない。また、1,5-D-アンヒドロフルクトース (以下、1,5-AFという) を強アルカリ条件下にすると、多数の化合物が生成し、その化合物が生成される過程の中間物質の一つがAPPであることが報告されている ([非特許文献3] 参照)。しかし、この条件下ではAPPは中間体であり、その反応をAPPで停止させる方法やAPPの調製法に関しては記述されていない。

【0005】

APPは真菌類のPezizales目 (例えば、*Picaria leiocarpa* および *Anthracobia melaloma*) ならびにTuberales目 (例えば *Tuber melanosporum*) の菌体抽出液を1,5-AFに作用させ生成できることも報告されているが、この方法はミリグラム単位での調製しか行われていない。この調製方法は、かなりの手間や時間を要するにも関わらず低収率であり、効率も悪いため、産業上利用できるものではなかった。

【0006】

最近では、酵素を用いたAPPの生産方法として、生産条件を詳細に設定した方法が特許出願されている ([特許文献4]、[特許文献5]、[特許文献6] 参照)。しかし、この方法では酵素反応に長時間を要するうえ、酵素生産にも時間を費やす必要がある。

【0007】

一方、1,5-AFは、澱粉などの α -1,4-グルカンをもとに α -1,4-グルカンリアーゼで分解することによって調製できる糖質であり、安価に大量に生産できる。この糖質については抗菌剤、抗酸化剤および着色剤としての利用が特許出願されている。その公開公報には1,5-AFが細菌の増殖を効果的に抑制することが記載されている ([特許文献7] 参照)。

【特許文献1】WO00/56838

【特許文献2】WO02/26060

【特許文献3】WO02/26061

【特許文献4】WO03/038085

【特許文献5】WO03/038107

【特許文献6】WO03/038084

【特許文献7】特願平11-266336

【非特許文献1】Shafizadeh, F., et al., Carbohydr

. Res. 67, 433-447 (1978)

【非特許文献2】M. -A. Baute, phytochemistry, 33, 41-45 (1993)

【非特許文献3】Ahmand, T., PhD Thesis, The Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden (1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、APPの効率的な製造方法を提供することにある。

【0009】

本発明のさらに他の目的および利点は、以下の説明から明らかになる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、1, 5-AFおよびAPPについて鋭意研究を重ねた結果、1, 5-AFを高温で一定時間加熱することにより、容易にAPPを調製できることを発見し、その究明事実に基づき本発明に到達した。

【0011】

すなわち、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第1に、1, 5-AFをpH10以下で100℃以上の温度で、加熱することを特徴とする、APPの製造方法によって達成される。

【0012】

さらに、本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、第2に、1, 5-AFを抗酸化剤の共存下で加熱することを特徴とする、APPの効率的な製造方法によって達成される。

【発明の効果】

【0013】

本発明法によれば、1, 5-D-アンヒドロフルクトース溶液をpH10以下の条件下において、加熱することで、アスコピロンPを従来の方法よりも非常に効率良く、かつ安価に製造することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の製造方法で用いられる1, 5-AFは、オゴノリから抽出・精製した α -1, 4-グルカンリアーゼで澱粉を分解することにより調製される。また、かくして調製された1, 5-AFは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定して純度を約99%以上とすることができる。

【0015】

加熱条件とAPPの生成率の関係は、1, 5-AF溶液を加熱して得られた溶液について、APP生成率を調べて求めることができる。

【0016】

APP生成率は以下の要領で算出する。

【0017】

減圧下で乾燥させたAPPを用いて調製した標準溶液について表1に記載の条件でHPLC分析を行い、得られたクロマトグラムにおけるAPPのピーク面積を基に、測定試料 (本発明の製法で製造したAPP含有溶液) のHPLCクロマトグラムにおけるAPPのピーク面積より生成されたAPP量を算出する。APP生成率は加熱処理に使用した1, 5-AFの量に対して得られたAPPの生成量の重量%を算出することで求められる。

【0018】

【表1】

HPLC測定条件

使用カラム：分離モード	配位子交換
カラム温度	30℃
流速	1.0ml/min
溶離液	蒸留水
検出器	示差屈折計

【0019】

本発明におけるAPPの製造法では、1, 5-AF溶液をpH10以下の条件下で100℃以上の温度で加熱する。pHがそれより高くてもAPPは生成されるが、多数の副産物が生成する為、APPの分離、精製が非常に困難となる。好ましい条件としてはpH2ないし7未満であり、APPの安定性等を考慮すると、より好ましくはpH2ないし4である。

【0020】

本発明のAPP製造法における加熱条件としては、120℃以上の温度が好ましく、より好ましくは140～250℃である。また、加熱時間は加熱温度や加熱方法によっても異なるが、例えば100℃以上で1秒～24時間であり、好ましくは120℃以上で1秒～5時間、より好ましくは、140～250℃で1秒～2時間程度である。

【0021】

加熱方法としては、各種加熱機器が挙げられる。例えば、加熱機器として加圧蒸気殺菌器、ジェットクッカー、オイルバス等があり、その加熱媒体としては、各種のオイル、蒸気等がある。

【0022】

1, 5-AFを溶解する溶媒としては、例えば、水あるいは水と水混和性有機溶媒との混合物を挙げることができる。水混和性有機溶媒としては、例えば、炭素数1～3の低級アルコール等が挙げられる。

【0023】

溶媒中における1, 5-AFの濃度は、例えば0.1～90重量%とすることができる。

【0024】

また、本発明者らは、APPが抗酸化剤共存下で安定化する傾向があることを見出した。従って、1, 5-AF溶液に他の抗酸化剤を添加して加熱処理を行うことで更に効率よくAPPを製造することができる。他の抗酸化剤としては、例えば、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、エリソルビン酸、エリソルビン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、トコフェロール、カテキン類、ポリフェノール、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン等が挙げられるが、なかでも特にアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムが好ましい。

【0025】

かくして、上述の方法によって得られたAPP含有溶液よりAPPを精製する為には、例えばクロマトグラフィーにより分離精製を行うことができる。得られた試料について電子衝撃イオン化法による質量分析法、¹H-NMR法および¹³C-NMR法を用いて分析すると、質量分析法ではm/z 144に分子イオン(M⁺)が観測され、またNMRでは表2に記載された結果が得られた。これらの質量分析とNMRの値は既に報告されているAPPのそれらの値（〔非特許文献2〕参照）とすべて一致し、本発明の方法で製造された物質がAPPであることが確認された。

【0026】

【表2】

¹³ C シフト (ppm)	80.3	36.9	192.0	135.3	152.1	63.0
¹ H シフト (ppm)	4.58	2.52	2.88	7.54	3.89	3.79

【0027】

本発明の製造方法により得られたアスコピロンPは、食品工業、医薬品工業、化学工業などで利用可能である。利用方法としては、例えば、アスコピロンPを食品の原料または製品に添加することが可能である。また、別の方法として、製品に1, 5-AFを添加し、食品の製造工程中に本発明方法を実施することも可能である。例えば、食品の製造工程では往々にして、調理、殺菌などの加熱処理工程が存在する。従って、食品原料に予め1, 5-AFを添加しておき、本発明の条件にて加熱することで、食品中でのアスコピロンPの製造が行われる。

【0028】

以下、実施例により本発明を更に詳述する。本発明は、これらによって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0029】

実施例1

1, 5-AF (純度99%) を水に溶解して濃度10%の水溶液を調製し、加圧加熱殺菌器を用いて125℃、135℃、145℃、155℃でそれぞれ加熱し、各温度における加熱時間とAPP生成率の関係を調べた。その結果、図2に示すように、これらの加熱条件で1, 5-AFからAPPが生成すること、さらに加熱温度125℃から155℃の範囲では155℃が最も生成率が高いことが明らかとなった。また、過度に加熱を行うと、一旦生成されたAPPが分解し、結果的に収率が低減することも判った。以上の結果から、1, 5-AFを高温で一定時間加熱することにより、短時間で効率良くAPPを調製できることが明らかとなった。

【0030】

実施例2

濃度10%の1, 5-AF水溶液を下記表3に記載のpH調整剤でpH1～13まで調整した試料を121℃、30分間オートクレーブで加熱し、APP生成に対するpHの影響を調べた。結果を図3に示す。

【0031】

【表3】

pH	pH調整剤
1. 0	塩酸
3. 0	酢酸緩衝液
5. 0	酢酸緩衝液
7. 0	りん酸緩衝液
9. 0	炭酸緩衝液
11. 0	水酸化ナトリウム水溶液
13. 0	水酸化ナトリウム水溶液

【0032】

試験結果より、pH条件がAPPの生成に大きく影響し、特に酸性条件下で効率よく生成されることが明らかとなった。

【0033】

実施例3

抗酸化剤の共存下で1, 5-AFを加熱した。濃度10%の1, 5-AF (純度99%) 水溶液に表4に記載の濃度で抗酸化剤を添加し、加圧加熱殺菌器を用いて145℃で15分間加熱したところ、抗酸化剤を添加したほうがAPP生成率が高くなった。

【0034】

【表4】

試験区	APP生成率 (%)
無添加 (AFのみ)	38
アスコルビン酸 1%	53
EDTA-Na 0.1%	42
アスコルビン酸 1% EDTA-Na 0.1%	53

【0035】

実施例4

酢酸緩衝液を用いてpH3.0に調整した濃度10%の1, 5-AF水溶液をオートクレーブにて121℃で30分間、60分間それぞれ加熱しAPP生成率を確認した。その結果を表5に示す。

【0036】

【表5】

加熱時間 (分)	APP生成率 (%)
30	36
60	45

【0037】

実施例5

酢酸緩衝液を用いてpH3.4に調整した濃度10%の1, 5-AF溶液をステンレス製の耐圧容器に充填し、120℃、150℃、170℃のオイルバス中でそれぞれ一定時間加熱した後、APP生成率を確認した。結果を図4、5および6に示した。図6の結果のとおり、170℃、5分間の加熱で約35%のAPPが生成された。また、それぞれの加熱温度において適した加熱時間があり、効率のよい加熱条件が明らかとなった。

【0038】

実施例6

酢酸緩衝液を用いてpH3.0に調整した濃度30%の1, 5-AF水溶液をステンレス製の耐圧容器に入れ160℃、180℃および200℃のオイルバス中でそれぞれ3分間加熱してAPPを調製した。その結果を表6に示す。

【0039】

【表 6】

温度	APP生成率 (%)
160℃	9.6
180℃	22.2
200℃	31.4

【0040】

実施例 7

酢酸緩衝液を用いて pH 3.5 に調整した濃度 10% の 1, 5-AF 水溶液に抗酸化剤を表 7 に記載の濃度で添加し、ステンレス製の耐圧容器に入れ密閉し、125℃ のオイルバス中で、30 分間加熱し、APP を調製した。その結果、アスコルビン酸を添加したものは、無添加区の約 2 倍の APP が生成された。

【0041】

【表 7】

試験区	APP生成率 (%)
無添加	10.7
アスコルビン酸 1%	21.3
クロロゲン酸 1%	13.9

【0042】

実施例 8

濃度 10% の 1, 5-AF 水溶液と濃度 10% の 1, 5-AF 水溶液にアスコルビン酸を 1% 添加したものをステンレス製の耐圧容器に入れ、180℃ のオイルバス中で 3~15 分間加熱した。その時の APP 生成率を図 7 に示す。アスコルビン酸添加区で 3 分間加熱した場合、1, 5-AF の約 40% が APP に変換されており最も生成率が高かった。

【0043】

実施例 9

市販のルーを使用して、カレーを調理した。1, 5-AF を 0.1% 添加し、真空パックした後 135℃、5 分間加熱殺菌した。冷却後、カレーの中の APP 含有量を測定したところカレー全体の 0.01% 含まれていることが判った。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】アスコピロン P (2-Hydroxymethyl-5-hydroxy-2, 3-dihydro-4H-pyran-4-one) の構造式

【図 2】1, 5-AF 水溶液を 125℃、135℃、145℃、155℃ でそれぞれ加熱した際の加熱時間と APP 生成率の関係

【図 3】1, 5-AF 水溶液を pH 調整後加熱処理した際の APP 生成率の比較

【図 4】1, 5-AF 水溶液 (pH 3.4) を 120℃ の温度で加熱した際の加熱時間と APP 生成率の関係

【図 5】1, 5-AF 水溶液 (pH 3.4) を 150℃ の温度で加熱した際の加熱時間と APP 生成率の関係

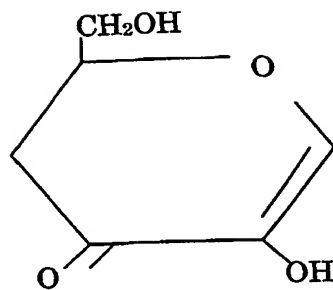
【図 6】1, 5-AF 水溶液 (pH 3.4) を 170℃ の温度で加熱した際の加熱時間と APP 生成率の関係

【図 7】1, 5-AF 水溶液にアスコルビン酸 1% を添加して加熱した際の APP 生成率

【書類名】図面

【図 1】

図 1



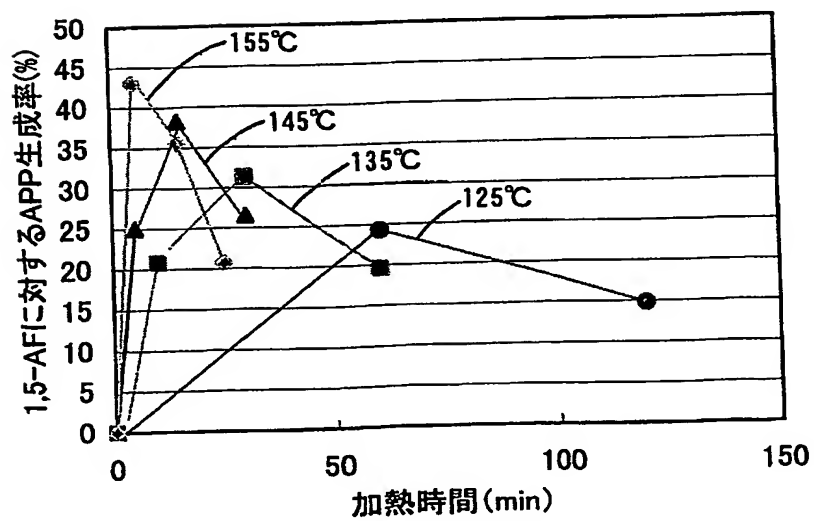
アスコピロンP

(2-Hydroxymethyl-5-hydroxy-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one)

【図 2】

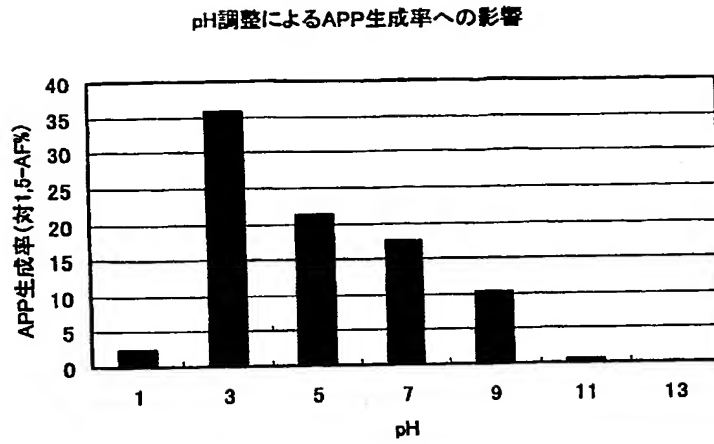
図 2

加熱処理によるAPP生成率



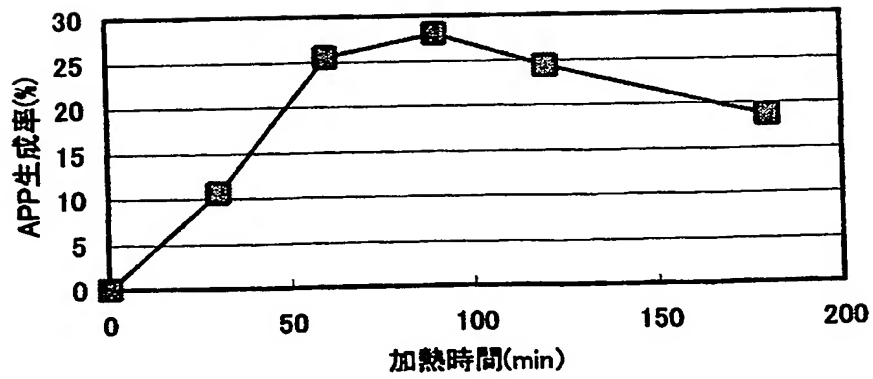
【図 3】

図3



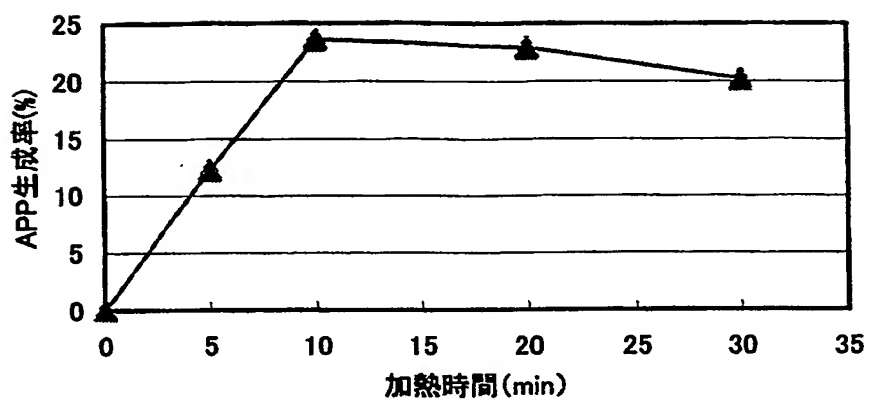
【図 4】

図4



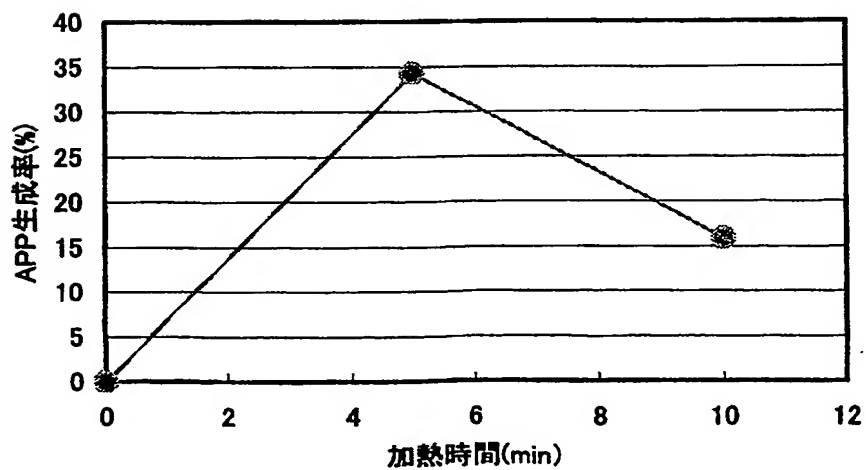
【図5】

図5



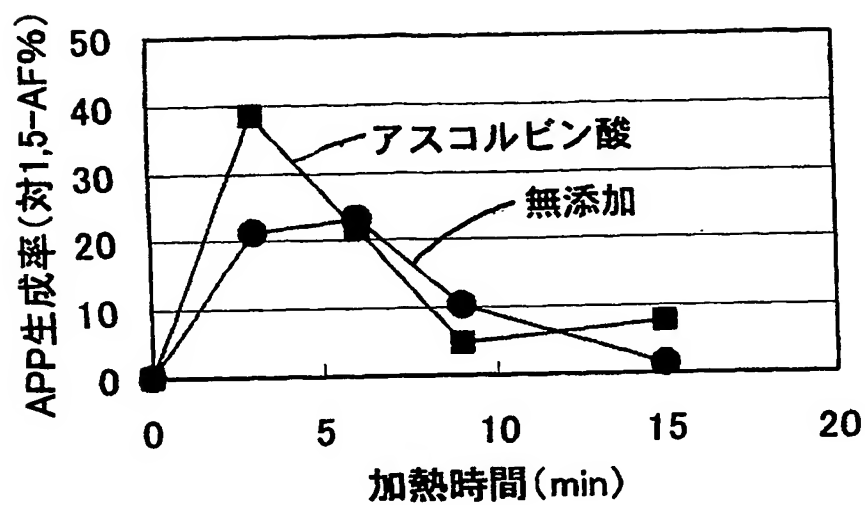
【図6】

図6



【図7】

図7



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 1, 5-D-アンヒドロフルクトースからアスコピロンPを効率良く製造する方法を提供すること。

【解決手段】 1, 5-D-アンヒドロフルクトースの溶液をpH10以下の条件の下、100℃以上で加熱してアスコピロンPを製造する方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 9 1 1 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 1 5 0 0 4]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1 9 9 0 年 1 1 月 1 日
新規登録
鹿児島県鹿児島市南栄 3 丁目 2 0 番地
日本澱粉工業株式会社